

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
(Direktor: Prof. Dr. J. Tomcsik)

Die Darstellung der Bakterienzellwand im Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe der «nichtspezifischen Zellwandreaktion»

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Raimund von Bertrab

von Boltigen (Bern)



19

57

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. *J. Tomcsik*.

Tag der Promotion: 21. November 1956.

Sonderdruck aus der «Schweizerischen Zeitschrift für Allgemeine Pathologie
und Bakteriologie» Vol. 20, No. 3, 1957.

**Die Darstellung der Bakterienzellwand
im Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe der
«nichtspezifischen Zellwandreaktion».**

Im Laufe ihrer Lysozymstudien an einer in die *Bac. megaterium*-Spezies einzuordnenden Variante (*Bacillus* «M») machten *Tomcsik* und *Guex-Holzer* (1953, 1954 a) die unerwartete Feststellung, daß in Anwesenheit des im sauren Bereich (pH 3—4) keine Lysozymwirkung aufweisenden Eiklars die Kapsel von *Bazillus M.* plötzlich sichtbar wurde. Erhöhung wie Erniedrigung des pH führten zum Verschwinden dieses Phänomens. Dasselbe konnte sowohl mit verschiedenen anderen Proteinen als auch mit anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien in einem bestimmten pH-Bereich reproduziert werden. Der optimale Bereich dieser «nichtspezifischen Kapselreaktion» war einerseits von der Lage des isoelektrischen Punktes (I. P.) der Proteine, anderseits von der Bakterienspezies abhängig. Diese Beobachtungen führten zur Annahme, daß es sich hier um eine «streng pH-abhängige, salzähn-

liche, komplexe Verbindung zwischen der Kapselsubstanz einerseits und dem Eiweißkörper andererseits handelt, die eine Veränderung der optischen Eigenschaften nach sich zieht» (*Tomcsik und Guex-Holzer*, 1953). Diese Verbindung äußert sich in einer mikroskopischen Präzipitation an der Bakterienzelloberfläche und kommt in einer interisoelektrischen Zone zustande, «in der die Proteine, von ihrem isoelektrischen Punkt abhängig, positiv, und die Bakterien, von dem tieferliegenden isoelektrischen Punkt abhängig, negativ geladen sind» (*Tomcsik*, 1956 a). Im Verlaufe weiterer Untersuchungen über Kapsel und Zellwandreaktionen der Bazillusgruppe konnten *Tomcsik* und *Guex-Holzer* (1954 b) auch die Zellwand von trypsinbehandelten M-Bazillen durch eine Proteinreaktion in einem bestimmten pH-Bereich darstellen. In Analogie zur Kapselreaktion wurde auch dieses Phänomen als eine «*nichtspezifische Zellwandreaktion*» bezeichnet.

Was die chemischen Grundlagen der nichtspezifischen Kapsel- und Zellwandreaktionen betrifft, so sind in der Eiweißchemie ähnliche, hauptsächlich auf elektrostatischen Kräften beruhende Verbindungen als «Symplexe» (*Tomcsik*, 1956 a) oder als «protein interactions» (*Klotz*, 1953) bekannt. *Guex-Holzer* und *Tomcsik* (1956) und *Tomcsik* und *Guex-Holzer* (1954 a) gelang es auch, vom immunochemischen Standpunkt aus die Proteinreaktion weiter aufzuklären, indem sie aus der Kapsel des *Bacillus M.* ein Polypeptid und ein Polysaccharid und aus dessen Zellwand ein Mucoprotein rein darstellen konnten. Sowohl das Polypeptid wie das Mucoprotein präzipitierten Rinderalbumin in saurem pH-Bereich, das Polysaccharid hingegen gab keine Reaktion. Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Proteine wie der Polypeptidantikörper an *Bac. M.* nur eine homogene Kapselreduktion hervorrufen, währenddem das homologe Immuneserum (Polysaccharidantikörper) eine komplexe Kapselstruktur aufdeckt (21, 26, 18, 19). Andererseits reagieren das reine Kapselpolysaccharid und das Zellwand-Mucoprotein serologisch gleich (26, 18, 6), so daß anzunehmen ist, daß das Polysaccharid in der Zellwand in einer komplexeren Verbindung vorliegt, bzw. als prosthetische Gruppe in das Mucoprotein eingebaut ist. *Guex-Holzer* und *Tomcsik* (1956) nehmen auch an, daß dieses Mucoprotein oder eine vielleicht noch komplexere Substanz das eigentliche Substrat des Lysozyms darstellt.

Während auch von *Löfström* (1944) und von *Jacox* (1947) an

Pneumokokken unter gewissen Umständen nichtspezifische Kapselreaktionen mit Proteinen beobachtet wurden, sind in der Literatur, außer der erstmaligen Beschreibung der nichtspezifischen Zellwandreaktion an *Bac. M.* durch *Tomcsik* und *Guex-Holzer* (1954 b), keine ähnlichen Beobachtungen mitgeteilt worden. Es wurde uns daher die Frage gestellt, auf welche weitere *Bacillus*-spezies sich die Proteinreaktion der Zellwand anwenden ließe. Diese besitzt gegenüber der spezifischen Antikörperreaktion (25) den beachtlichen Vorteil, daß sie ohne größeren Aufwand, d. h. ohne Erzeugung von Immunseren ausgeführt werden kann. In ihrer Einfachheit läßt sie sich mit den Färbeverfahren in der Hellfeldmikroskopie vergleichen (*Tomcsik*, 1956 a). Wie für die nichtspezifische Kapselreaktion mußte auch für die Zellwandreaktion eine strenge pH-Abhängigkeit erwartet werden.

Material und Methodik.

A. Material.

1. Untersuchte Stämme.

Bacillus M. (Mu 12 S) stellt ursprünglich eine bewegliche Anthraxmutante dar, welche in atmosphärischer CO_2 -Konzentration auf Nähragar Kapseln bildet. Neuerdings wird dieses Bacterium in die Spezies *Bac. megaterium* eingereiht (19, 20). — *Bac. megaterium* (Mg. 4). — *Bac. cereus* (C 5). — *Bac. anthracis* (A 6). — *Bac. subtilis* (Su. 1 und Su I 2 c). — Alle Stämme sind freundlicherweise von Herrn Prof. *Tomcsik* zur Verfügung gestellt worden.

2. Nährböden.

Außer *Bac. M.* und *Bac. anthracis* wurden die Stämme auf CCY-Nähragar nach Gladstone-Fildes (1940) bei 28° C 15—20 Std. gezüchtet. Das Wachstum wurde in phys. NaCl-Lösung suspendiert und mehrmals gewaschen. — Die Inkubationstemperatur für *Bac. anthracis* betrug 37° C. — Um unbekapselte Bazillen zu erhalten, mußte *Bac. M.* in einer mittels Wasserstrahlpumpe durchlüfteten Gladstone-Fildes-Bouillon gezüchtet werden.

3. Puffer und pH-Messung.

Für den Bereich pH 1,1—2,0 wurde der *Glykokoll-Puffer nach Sørensen*, für pH 2,2—8,0 der *Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McIlvaine* (Documenta, Geigy 1955) verwendet. Es wurden Pufferreihen mit einem Abstand von je 0,4 pH-Einheiten hergestellt. Elektrometrische Kontrollen ergaben eine befriedigende Genauigkeit und eine gute Haltbarkeit der sterilen Pufferlösungen. Die pH-Messungen wurden mit dem pH-Meßgerät TENA Bern vorgenommen.

4. Proteine.

1. *Bovine Albuminfraktion V* (Armour). Herstellung einer 2% Lösung im Mörser mit Aqua dest. 2. *Haemoglobin* (Difco). 2% Lösung in Aqua dest.

3. *Pferdeserum-Globulin* (Guex-Holzer, 1953). 1% Lösung. 4. *Casein* (Difco). Eine 1% klare Lösung kann nur durch Alkalisieren mit einigen Tropfen 10% NaHCO_3 erreicht werden. 5. *Bacto-Trypsin* (Difco). Eine 1% Lösung in phys. NaCl wurde für die Zellwandreaktion verwendet. 6. *Trypsin Siegfried*. 2% Lösung zur Cytoplasmaverdauung. 7. *Kristallines Lysozym* (Armour). 1% Lösung in Aqua dest.

5. Optische Ausrüstung und Photographien.

Phasenkontrastkondensor der Fa. Zeiss, Jena. — Die photographischen Aufnahmen wurden mit der mikrophotographischen Aufsatzkamera M 731 der Fa. Wild & Co., Heerbrugg, hergestellt. Wenn nicht anders vermerkt, sind die Aufnahmen in einer linearen Vergrößerung von 1 : 1125 wiedergegeben.

B. Methodik.

Da im feuchten Präparat die Zellwand der untersuchten Bazillen vollkommen unsichtbar ist, mußten dieselben einer Vorbehandlung (Mikrodissektion, Tomcsik, 1956 a) unterworfen werden, welche die Isolierung der Zellwand vom Protoplasten zum Ziele hat.

1. Trypsinbehandlung.

Die frische und mehrmals gewaschene Kultur wird in 75 ccm McIlvaine-Puffer (pH 7,8) suspendiert (Trübungsgrad McFarland Nr. 6—7). Es werden 25 ccm einer 2% Trypsinlösung hinzugegeben. Zusatz von 10 ccm Chloroform gegen Verunreinigungen. Inkubation bei 37° 18—24 Std. Die stark aufgehellte Suspension wird vorsichtig abpipettiert und gewaschen. Die Suspension kann in phys. NaCl mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt werden.

2. Schüttelbehandlung im Mickle-Vibrator (Mickle, 1948).

Zu 3 Teilen einer Kochsalzsuspension wird 1 Teil Glaskugeln (Durchmesser 0,2 mm) hinzugegeben. Die Schüttelzeiten werden für die einzelnen Stämme durch mikroskopische Kontrollen bestimmt. Sie variieren zwischen 30—120 Min., um ca. 90% leere, aufgebrochene Zellen zu erhalten. Das Waschen der geschüttelten Bakterien muß mit besonderer Sorgfalt vorgenommen werden, um Verunreinigungen der isolierten Zellwände mit Cytoplasma-Material zu vermeiden.

3. Lysozymbehandlung.

Sie erfolgt mit ca. alle 5 Monate frisch zu gewinnendem *Eiklar*. 3 Teile einer homogenen Bakteriensuspension (McFarland Nr. 5—6) werden mit 1 Teil *Eiklar* (Endverdünnung 1 : 20 bis 1 : 400, je nach Bakterienspezies) versetzt und gut durchmischt. Die Inkubation erfolgt bei Zimmertemperatur. Die sphärische Transformation der Protoplasten (22, 18) wird mikroskopisch verfolgt. Die *Eiklar*-verdünnung wird so gewählt, daß der Vorgang auf Höhe der gemischten oviden und sphärischen Transformation der Protoplasten durch Zusatz von 38% Formalin (Endverdünnung 4—10%) sicher unterbrochen werden kann. Um eine schon im Laufe der Protoplastenabrundung auftretende Schädigung derselben — schlechte Abrundung, Auftreten von «ghosts» (Weibull, 1953) — zu vermeiden, hat sich uns als «Stabilisator» die Suspension

der Bakterien in einer *isotonischen Ringer-Saccharoselösung* (10,3% Saccharose + Ringer $\bar{a}\bar{a}$) bewährt.

Nicht alle untersuchten Bazillusarten lassen sich mit allen drei Mikrodissektionsmethoden behandeln. *Bac. cereus* und *Bac. anthracis* sind Lysozym-resistent. Die Schüttelbehandlung von *Bac. subtilis*, die Trypsinverdauung von *Bac. anthracis* ist für die Erzielung schöner Zellwandpräparate ungeeignet.

4. Ausführung der Zellwandreaktion.

Zu je 0,5 ccm Puffer werden 0,25 ccm vorbehandelte Bakteriensuspension und 0,25 ccm frisch hergestellte Proteinlösung hinzugegeben und gut durchmischt. Die Zellwandreaktion wird anschließend an feuchten Präparaten mit dem Phasenkontrast abgelesen. Zur Ausführung der Lysozym-Zellwandreaktionen werden zu 0,5 ccm Puffer und 0,25 ccm Bakteriensuspension 0,1 ccm 1% Lysozym, und zur Verhütung der Zellwandauflösung, sofort anschließend 0,25 ccm Formalin hinzugegeben.

Ergebnisse.

I. *Bacillus M.* (Mutante, Mu 12 S).

A. Trypsinbehandelte Bakterien.

Abb. 1 zeigt *Bac. M.* nach 24stündiger Trypsinverdauung. Die Bakterienleiber zeigen eine deutliche Aufhellung (vgl. Abb. 7). Die Verdauung des Cytoplasmas erscheint aber, auch nach längerer Trypsineinwirkung, unvollständig, wobei gewisse Verdichtungen in unregelmäßiger Anordnung auffallen. Eine Zellwand läßt sich nur undeutlich feststellen. Bei Überführung von 0,25 ccm der Bakteriensuspension in 0,5 ccm Puffer (ph 1,1—3,0) läßt sich ein überraschendes Phänomen nachweisen.

Abb. 2: Es findet eine optisch eindruckliche Aggregation des trypsinresistenten Cytoplasmarestes statt, so daß die Zellwand, wenn auch sehr schwach, etwas deutlicher sichtbar wird und der übrige Teil der Bazillen optisch «leer» erscheint. Wir haben somit vom Cytoplasma isolierte Zellwände vor uns, deren sichtbare Darstellung mittels der nichtspezifischen Zellwandreaktion sehr gut gelingt. Die Resultate der Zellwandreaktion mit verschiedenen Proteinen sind in Tabelle I zusammengefaßt. Durch die Proteinreaktion erfährt die vorher kaum sichtbare Zellwand eine Verstärkung und geringe Verdickung ihrer Konturen. Die Umrisse der Zellwand bieten aber einen klaren, homogenen Aspekt dar und lassen keinen Verdacht auf Verunreinigung mit Cytoplasmamaterial entstehen. Die Abschätzung der Intensität der Reaktion verlangt einige Übung und fortwährendes Vergleichen mit negati-

TABELLE I.

Bacillus M. Zellwandreaktionen mit verschiedenen Proteinen.

pH	1,1	1,6	2,2	2,6	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	5,6
Albumin ¹	± ²	+	++	++	++	+++	+++	++	±	—	—
Hämoglobin	+	++	++	+++	+++	++++	++++	+++	++	+	—
Globulin	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
Casein	+	++	++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
Trypsin	++	++	++	+++	+++	+	±	—	—	—	—

¹ Endkonzentration von Albumin und Hämoglobin: 0,5%, von Globulin, Casein und Trypsin: 0,25%.

- ² ± : Zweifelhaft oder vereinzelt schwach positiv.
 + : schwach positive Zellwandreaktion.
 +++ : stark positive Zellwandreaktion.
 ++++ : sehr starke, optimale Zellwandreaktion.

ven Kontrollen und mit stärker und schwächer reagierenden Präparaten der pH-Reihe. Die stärkste Affinität zur Zellwand weist das Hämoglobin (Tab. I) auf, welches im optimalen Bereich die Zellwand intensiv schwarz erscheinen läßt und eine deutliche Verdickung der Konturen hervorruft, so daß man den Eindruck einer Präzipitation gewinnt. Etwas schwierig erweist sich auch die Ablösung der Casein-Zellwandreaktion (Abb. 3), da im pH-Bereich 2,6—4,2 eine intensive Ausflockung des nur im alkalischen Milieu löslichen Caseins erfolgt. Durch Zugabe der Bakteriensuspension an letzter Stelle, nach erfolgter Ausflockung im Puffer-Casein-Gemisch, lassen sich trotz dieses unerwünschten Phänomens klare und intensive Zellwandreaktionen erzielen.

Von Interesse war es auch, das schon oben erwähnte merkwürdige Verhalten des trypsinresistenten Cytoplasmarestes gegenüber der Änderung des pH zu untersuchen, und zwar ohne und mit Proteinzusatz. Ohne hier auf die mögliche Natur dieser Cytoplasmareste einzugehen, bezeichnen wir ihre bei pH 1,1 und 2,2 besonders deutliche, optisch intensive Aggregation als «Cytoplasm-Säurereaktion» (Abb. 2). Diese schon von *Tomcsik* und *Guex-Holzer* (1954) beobachteten «rod-like or spherical bodies» besitzen bei pH 1,1 und 2,2 das kleinste Volumen. Sie weisen zum Teil Hantel- und Keulenform auf, zum Teil zeigen sich Brownsche Molekularbewegung aufweisende Kügelchen, oder es finden sich axiale Fäden. Bei zunehmenden pH nehmen die Cytoplasmakörperchen an Volumen zu, wogegen ihre optische Reaktion abnimmt. Ihr Ver-

TABELLE II.

Bacillus M. «Cytoplasma-Säurereaktion» und «Cytoplasma-Proteinreaktion» mit kristallinem Lysozym.

	pH	1,1	2,2	3,0	3,4	3,8	4,2	5,0	6,0	7,0	8,0
0,5 ccm Puffer + 0,25 ccm Suspension	Cplr.	+++	+++	+	±	±	±	±	—	—	—
Lysozym 0,1%	Cplr.	+++	+++	+++			++	++	++	+	—
	Zwr.	+	++	+++			++	++	++	+	—

Cplr. = Reaktion des Cytoplasmakörperchens ohne oder mit Protein.

Zwr. = Zellwandreaktion.

Für übrige Bezeichnungen siehe Tabelle I.

halten in Pufferlösung ohne und mit Proteinzusatz ist in Tabelle II dargestellt. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß man der Cytoplasma-Säurereaktion auch eine dem Reaktionsbereich des betreffenden Proteins entsprechende «Cytoplasma-Proteinreaktion» gegenüberstellen muß. Diese geht in einer etwas stärkeren optischen Intensität der betreffenden Zellwandreaktion parallel. Die Proteinreaktion mit kristallinem Lysozym (Tab. II), welche mit der Fermentwirkung nichts zu tun hat, ergibt eine besonders klare Darstellung der Zell- und Querwände. Die Intensität der Querwandreaktion überwiegt diejenige der lateralen Zellwände. Sehr deutlich kommt dabei auch die Beziehung der trypsinresistenten Cyto-

Abb. 1. *Bacillus M.* Trypsinbehandelte Bakterien in physiolog. NaCl.

Abb. 2. *Bacillus M.* «Cytoplasma-Säurereaktion.» Trypsinbehandelte Bakterien in Puffer pH 2,2.

Abb. 3. *Bacillus M.* Zellwandreaktion mit Casein 0,25%, pH 3,0.

Abb. 4. *Bacillus M.* Zellwand- und Cytoplasmareaktion mit Lysozym 0,1%, pH 3,0. Vergr. 1 : 1800.

Abb. 5. *Bacillus M.* Geschüttelte Bakterien in physiol. NaCl.

Abb. 6. *Bacillus M.* Zellwandreaktion mit Trypsin 0,25%, pH 2,6.

Abb. 7. *Bacillus M.* 18 Std. alte Bouillonkultur in physiolog. NaCl.

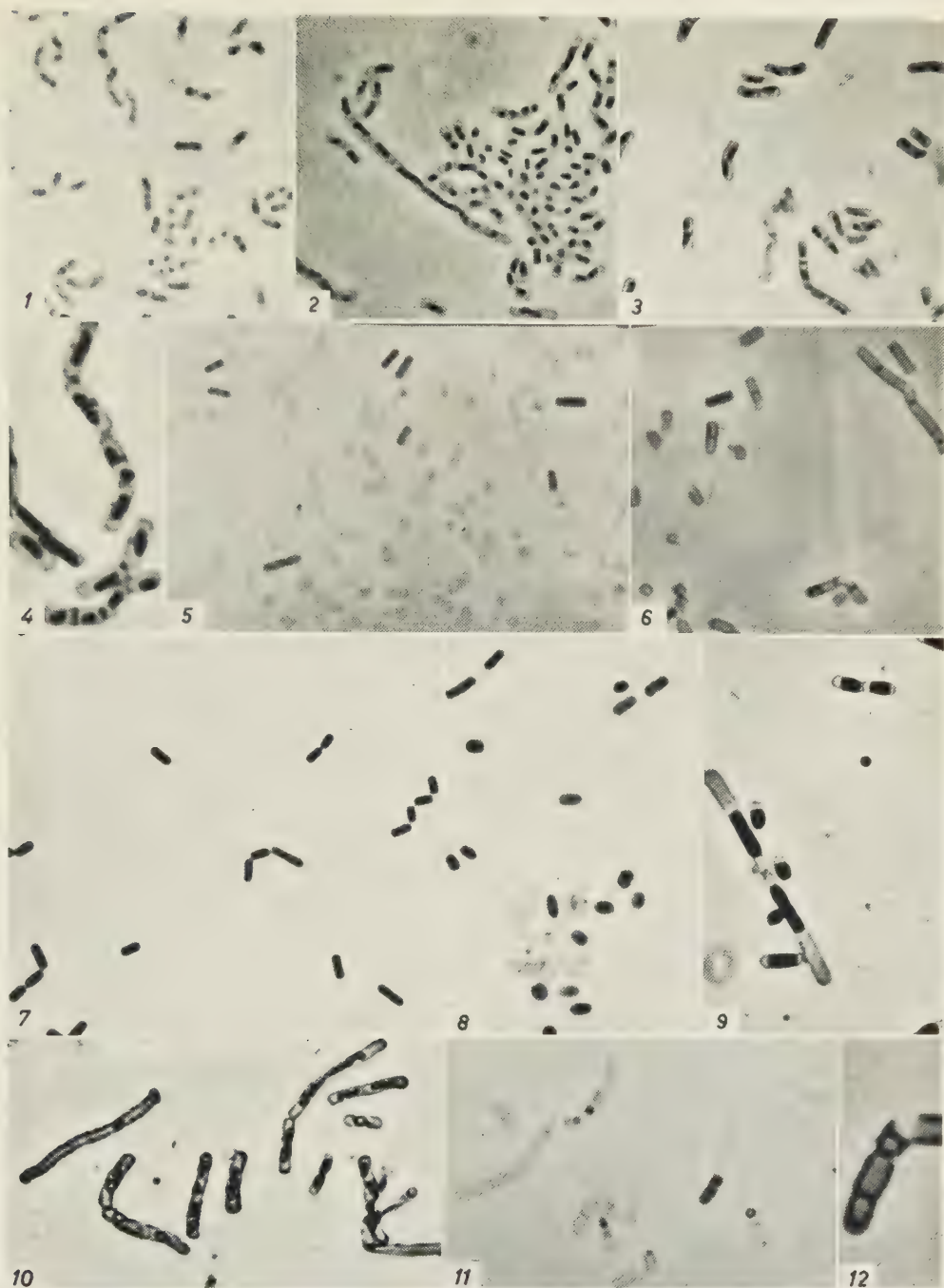
Abb. 8. *Bacillus M.* Stadium der gemischten ovoiden und sphärischen Protoplastentransformation. Eiklar 1 : 200, 10 Min.

Abb. 9. *Bacillus M.* Zellwandreaktion mit Albumin 0,5%, pH 3,8. Eiklar 1 : 200, Formalinzugabe nach 10 Min.

Abb. 10. *Bac. Mg.* 4. Trypsinbehandelte Bakterien. Zellwandreaktion mit Hämoglobin 0,5%, pH 3,4.

Abb. 11. *Bac. Mg.* 4. Geschüttelte Bakterien in physiolog. NaCl.

Abb. 12. *Bac. Mg.* 4. Zellwandreaktion mit Hämoglobin 0,5%, pH 3,8. Vergr. 1 : 2250.



plasmakörperchen zu den Querwänden zum Ausdruck (Abb. 4): Jede Zelle weist ein Cytoplasmakörperchen auf, welches einerseits zentral oder polar gelagert ist oder andererseits mit der Querwand in charakteristischer Weise in Verbindung steht. Diese geht manchmal durch einen etwas in die Länge gezogenen oder hantelförmigen Cytoplasmakörper mitten hindurch.

B. Schüttelbehandlung.

Bac. M. weist unter den von uns untersuchten Bacillusspezies die längste Schüttelzeit auf (120 Min.). Dieses stimmt mit den Feststellungen von *Tomcsik* und *Baumann-Grace* (1956) überein, wonach sehr starke Differenzen der Schüttelzeit innerhalb der *Megaterium*-Spezies bestehen. Bac. anthracis weist eine größere Zerbrechlichkeit der Zellwände auf (30, bzw. 40 Min.). Bei Verwendung eines größeren Volumens an Glaskugeln läßt sich die Schüttelzeit auf 60 Min. erniedrigen. Das Waschen der geschüttelten Suspension muß mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden, um eine sich in granulären Auflagerungen äußernde Verunreinigung der Zellwände mit Cytoplasmamaterial zu vermeiden. Die von *Salton* und *Horne* (1951) und *Salton* (1956 a) vorgeschlagene Prozedur zur Herstellung nicht verunreinigter Zellwände mittels Differentialzentrifugierung mußte für unsere Belange nicht angewendet werden. — Die isolierten Zellwände sind im Phasenkontrastmikroskop nur sehr schwach sichtbar (Abb. 5). Die Trypsin-Zellwandreaktion (Abb. 6) ergibt, ebenso wie die anderen Proteinreaktionen, eine sehr klare Darstellung der Konturen. Die Bruchstellen sind nur lateral gelegen. Die offensichtliche Starrheit der Zellwände kommt durch die Zellwandreaktion sehr schön zum Ausdruck. Das pH-Spektrum der verschiedenen Proteinreaktionen ist fast das gleiche wie für die trypsinverdauten Bakterien (Tab. I).

C. Lysozymbehandlung.

Abb. 7 zeigt Bac. M. vor der Eiklarzugabe. Die Bazillen weisen eine lebhaftige Beweglichkeit auf und bilden meistens Kettenformationen zu zwei bis vier Gliedern. Abb. 8 zeigt das Stadium der gemischten ovoiden und sphärischen Transformation der Protoplasten nach einer Einwirkungszeit von ca. 10 Minuten. In dem Agglomerat der Protoplasten sind zufällig einige aufgehellte Protoplastenschatten («ghosts»; *Weibull*, 1953) gerade erkennbar, welche zu den übrigen Protoplasten in starkem Kontrast stehen, so

daß anhand dieser Aufnahme die stabilisierende Wirkung der isotonischen Ringer-Saccharoselösung gut demonstriert werden kann. In diesem Stadium hat am besten die Formalinzugabe zu erfolgen. Da die Zellwand der lysozymbehandelten Bakterien im Gegensatz zu den Schüttel- und Trypsinbakterien infolge des Zellwandabbaues vollkommen unsichtbar ist, gestaltet sich ihre Demonstration mittels der Proteinreaktion besonders eindrucklich (Abb. 9). Die Reaktion der Lysozymbakterien mit verschiedenen Proteinen erreicht in den optimalen pH-Bereichen nicht die ganz gleiche Intensität wie diejenige der anders behandelten Bakterien.

II. *Bacillus megaterium* (Mg. 4).

A. Trypsinbehandlung.

Auch bei *Bac. megaterium* erfolgt keine vollständige Verdauung des Cytoplasmas. Dieses ist innerhalb der aufgehellten Zellen diffus verteilt. Die trypsinresistenten Cytoplasmaaggregationen im stark sauren pH-Bereich («Cytoplasma-Säurereaktion») bilden im Vergleich zu *Bac. M.* mehr langgestreckte, weniger charakteristische Elemente. Die Zellwände werden dadurch andeutungsweise sichtbar. Abb. 10 demonstriert die äußerst starke Präzipitation des Hämoglobins an die Zellwand bei pH 3,4. Was die Lysozym-Zellwandreaktion betrifft, ist ein analoges Verhalten zu *Bac. M.* festzustellen. Die Querwandreaktion ist auch hier gegenüber der Reaktion der lateralen Zellwand verstärkt.

B. Schüttelbehandlung.

Im Gegensatz zu *Bac. M.* sind die leeren Zellwände in phys. NaCl (Abb. 11) etwas deutlicher sichtbar. Abb. 12 zeigt die starke Hämoglobinreaktion und gibt zugleich die Erklärung, warum die Zellwand, deren Dicke weit unter dem Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops liegt, trotzdem im feuchten Präparat sichtbar ist: Durch die Mikrodissektion wird die zylindrische Form der Bakterien nicht zerstört. Die optische Dichte der (in der Projektion auf die Objektebene) am weitesten lateral gelegenen Zellwandpartien, welche durch die Lichtwellen im Längsschnitt durchdrungen werden, ist auch ohne Proteinreaktion genügend groß, um eine schwache Abbildung im Phasenkontrast hervorzurufen. Die in der Projektion auf die Objektebene zentral liegenden Zellwandpartien werden durch die Lichtquellen im Querschnitt getroffen

und können wegen der ungenügenden optischen Dichte nicht abgebildet werden. Dieser Raum bleibt daher optisch «leer». Durch die Proteinanlagerung erfahren auch diese zentralen Partien einen Zuwachs an optischer Dichte, so daß diese, wie es aus Abb. 12 ersichtlich ist, durch einen Schatten abgebildet werden.

In Tab. III sind die pH-Bereiche der verschiedenen Proteinreaktionen mit geschüttelten und trypsinbehandelten *Megaterium*-Bazillen aufgeführt.

TABELLE III.

Bac. megaterium. Zellwandreaktionen mit verschiedenen Proteinen.

pH	1,1	2,2	2,6	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	6,0	7,0	8,0
Albumin	+	+	++	++	+++	++++	++	—			—	—
Hämoglobin	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++	—	—	—	—
Globulin	+	++	+++	+++	++++	++++	—	—	—	—	—	—
Casein	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trypsin	+	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lysozym	+	+		++			++		—	—	—	—

C. Lysozymbehandlung.

Obwohl *Bac. Mg.* 4 eine gute Lysozymempfindlichkeit aufweist und bei einer Eiklarverdünnung von 1 : 400 schon nach 5 Min. die ersten freigesetzten Sphäroblasten sichtbar sind, ergaben sich in unseren Versuchen gegenüber *Bac. M.* insofern gewisse Unterschiede, als im Augenblick der Formalinzugabe die verschiedensten Stadien der Protoplastenabrundung erfaßt werden. Die Zellwand hat sich dabei entweder noch nicht genügend vom Protoplasten abgesetzt, oder sie ist im Stadium der sphärischen Transformation schon so weit abgebaut, daß sie sich nicht mehr durch eine Proteinreaktion darstellen läßt. Trotz dieser Schwierigkeit lassen sich der Mutante analoge Bilder erzielen. Wie bei *Bac. M.* weisen die Zellwandreaktionen der Lysozymbakterien wohl das gleiche pH-Spektrum auf wie die anders behandelten Bakterien. Die Reaktionen sind aber bedeutend weniger intensiv.

III. *Bac. cereus* (C 5).

Bac. cereus ist nur der Schüttelbehandlung zugänglich. Die isolierten Zellwände sind schon ohne Zellwandreaktion so gut und klar sichtbar, daß eine Verstärkung ihrer Konturen nicht nötig

wäre. Die Proteinreaktionen sind schwach und in ihren Grenzbereichen schwer zu beurteilen. Auch hier weist das Hämoglobin die stärkste Affinität zur Zellwand auf.

IV. *Bac. anthracis* (A 5).

Die Zellwände der geschüttelten Bakterien sind wie *Bac. cereus* ohne Zellwandreaktion im Phasenkontrast sehr gut sichtbar. In unseren Untersuchungen konnten wir keine positiven Proteinreaktionen beobachten, während *Tomcsik* (1954) eine spezifische Zellwandreaktion mit Polysaccharidantikörper nachweisen konnte.

V. *Bac. subtilis* (Su. 1 und Su. I 2 c).

Die Eiklarbehandlung von *Bac. Su. 1* bietet beträchtliche Schwierigkeiten. Der Stamm zeigte sich nur schwach lysozymempfindlich. Die Versuche wurden in jeweils frisch hergestellter isotonischer Saccharoselösung (10,3%) angestellt. In diesem Medium zeigten ca. $\frac{1}{2}$ der Zellen eine befriedigende Abrundung der Protoplasten. Störend erwies sich das Auftreten von vielen leeren Zellen, deren Wände, im Gegensatz zu den Zellen mit sich abrundenden Protoplasten, ohne Zellwandreaktion stärker sichtbar sind. Wir beobachteten häufig Plasmoptysephänomene, welche vermuten lassen, daß die Protoplasten nur durch Auflösung umschriebener Stellen der Zell- oder Querwände freigesetzt werden. Dieses stimmt mit den Feststellungen von *Salton* (1956 b) überein, wonach die Zellwände von *Bac. subtilis* durch das Lysozym nicht vollständig aufgelöst werden. Während wir bei *Bac. Su. 1* (London) nur die Albumin- und Hämoglobinreaktion (Fig. 1) überprüften, fanden wir bei *Bac. Su. I 2 c* — einem nicht identifizierten, aber mit großer Wahrscheinlichkeit zur *Subtilis*gruppe gehörenden Stamm — auch eine positive Globulinreaktion (Fig. 1).

TABELLE IV.

Obere pH-Grenzwerte der Zellwandreaktionen verschiedener *Bacillus*spezies im Vergleich zu den isoelektrischen Punkten (I. P.) der Proteine.

	I. P. der Proteine	Bac. M.	Bac. Mg. 4	Bac. C 5	Bac. Su. 1	Bac. Su. I 2 c
Lysozym	9,5	7,0	7,0	—	—	—
Hämoglobin	6,8	5,0	4,6	4,6	4,6	5,0
Globulin	5,4	4,6	4,2	4,2	—	4,6
Albumin	4,9	4,2	4,2	4,2	3,8	4,2
Casein	4,6	3,8	3,4	3,0	—	—
Trypsin	7,0 bzw. 10,4	3,4	2,6	—	—	—

Um die uns interessierende Beziehung der nichtspezifischen Zellwandreaktion zu den isoelektrischen Punkten der Proteine einerseits und der Bakterien andererseits, d. h. ihre pH-Abhängigkeit, ins Auge fassen zu können, haben wir unsere Ergebnisse in Tab. IV und in Fig. 1 zusammengefaßt.

Diskussion.

In ihrer ersten Veröffentlichung über die nichtspezifische Kapselreaktion konstatierten *Tomcsik* und *Gux-Holzer* (1953), daß «die Reaktionszone an erster Stelle vom isoelektrischen Punkt der Proteine abhängig ist». Die Zusammenfassung unserer Ergebnisse in Tab. IV und Fig. 1 liefern den Beweis, daß der nichtspezifischen Zellwandreaktion das gleiche Prinzip zugrunde liegt: Reaktion der Zellwandsubstanz mit verschiedenen Proteinen in einer interisoelektrischen Zone, welche hauptsächlich vom I. P. abhängig ist. Es entstehen durch gegensätzliche Aufladung von Proteingruppen und Zellwandsubstanz (Mucoprotein) elektrostatische, durch mikroskopische Präzipitation sich darstellende, salzartige Verbindungen. Solche «protein interactions» mit anderen großen Molekülen (Nukleinsäuren, Polysaccharide, Proteine und andere polymere Stoffe) sind bei *Klotz* (1953) ausführlich dargestellt. Vor allem *Bacillus M.* und *Bac. Mg. 4* zeigen klar die gesetzmäßige Abhängigkeit der Zellwandreaktion vom I. P. der Proteine, wobei das Trypsin eine Ausnahme bildet. Das elektrophoretische Verhalten dieses Eiweißes ist wegen seiner Unbeständigkeit und wegen anderer Faktoren kompliziert (*Green* und *Neurath*, 1954). Früher wurde der I. P. des Trypsins durch einfache Kataphorese bei pH 7,0 ermittelt (13). Durch die «moving boundary method» wird derselbe in neueren Untersuchungen (2) bei pH 10,4 gefunden. Diese komplizierten Verhältnisse werden durch das in unseren Versuchen gegenüber den anderen Proteinen abweichende Verhalten bestätigt, da man den I. P. des Trypsins per analogiam bei pH 4 annehmen müßte. Mit der Kapsel von verschiedenen Mikroorganismen gab Trypsin in den Untersuchungen von *Tomcsik* und *Gux-Holzer* (1953) keinerlei Reaktionen. Während dieselben Autoren keinen Unterschied zwischen Globulin- und Caseinreaktionen feststellen, konnten wir ein charakteristisches, von ihrem I. P. streng abhängiges Verhalten beobachten. Hämoglobin zeigte bei allen von uns untersuchten und der Zellwandreaktion zugänglichen Bazillusarten die stärkste Affinität zur Zellwand. Wie für die Kapselreak-

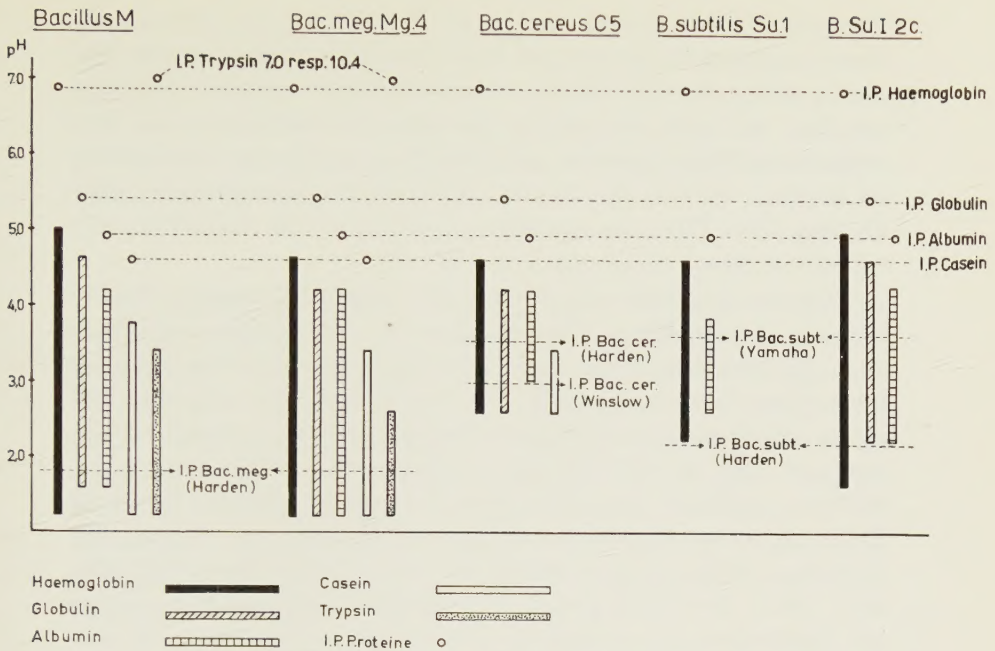


Fig. 1. pH-Bereiche der nichtspezifischen Zellwandreaktionen mit verschiedenen Proteinen.

tionen (24) lag auch bei unseren Zellwanduntersuchungen der optimale Reaktionsbereich dem oberen pH-Grenzwert, bzw. dem I. P. der Proteine, näher.

Während die gesetzmäßige Abhängigkeit der nichtspezifischen Proteinreaktionen vom I. P. der Proteine auch für die Zellwand als erwiesen betrachtet werden kann, herrschen in bezug auf den isoelektrischen Punkt der Bakterien unklare Verhältnisse. Die neuesten mittels Mikroelektrophorese ermittelten Angaben stammen von *Harden* und *Harris* (1953), von denen die uns interessierenden in Tab. V den in früheren Jahren ermittelten Werten gegen-

TABELLE V.

Die isoelektrischen Punkte verschiedener *Bacillusspezies*.

	Harden und Harris 1953 (7)	Andere Autoren zitiert nach (7)	
<i>Bac. megaterium</i>	1,8		
<i>Bac. cereus</i>	3,55	3,0	<i>Winslow, Falk und Caulfield</i> (1923)
<i>Bac. subtilis</i>	2,19	3,6	<i>Yamaha und Abe</i> (1934)
<i>Bac. anthracis</i>	—	3,1	<i>Yamaha und Abe</i> (1934)

übergestellt sind. Da die oberen pH-Grenzwerte der Proteinreaktionen bei *Bac. M.* um 0,4 pH-Einheiten höher liegen als bei *Bac. Mg. 4*, müßte der I. P. von *Bac. M.* etwas höher liegen als derjenige von *Bac. Mg. 4*. Da wir leider keine mikroelektrophoretischen Messungen ausführen konnten, muß die Frage vorläufig unbeantwortet bleiben, wieweit die nichtspezifischen Proteinreaktionen über die ungefähre Lage der isoelektrischen Punkte der Bakterien Aufschluß zu geben vermögen.

Interessant erschienen uns bei den trypsinbehandelten Bakterien die gleichzeitigen Proteinreaktionen der Cytoplasmakörperchen. Es war uns bisher nicht möglich, weitere Untersuchungen über deren Natur anzustellen. Ihre auffälligen und charakteristischen Beziehungen zu den Querwänden lassen die Vermutung aufkommen, daß es sich bei den trypsinresistenten Cytoplasmakörperchen vielleicht um Kernmaterial handeln könnte. In dieser Richtung weisen die jüngsten Untersuchungen von *Mason* und *Powelson* (1953), welche mittels des Prinzips von *Barer* und Mitarb. (1953) Kernteilungen an lebenden *Bac. coli* und *Bac. cereus* im Phasenkontrastmikroskop verfolgen konnten. Schon in den frühesten Kernteilungsstadien von *Bac. cereus* wurden von den genannten Autoren querverlaufende Septen beobachtet, welche mitten durch die sich teilenden Nuclei hindurchgingen. Auch von *Klotz* (1953) wird auf die «protein interaction» mit Nukleinsäuren hingewiesen, welche besonders gute Beispiele für Komplexbildungen seien, die durch gegensätzliche elektrostatische Aufladung zustande kommen.

Die nichtspezifische Zellwandreaktion besitzt gegenüber der spezifischen mit Antikörpern den Nachteil der geringeren Spezifität. Sie vermag nicht wie diese etwas über die Lokalisierung der Antigene in den Oberflächenstrukturen der Bakterienzelle auszusagen. Sie stellt aber eine einfache, elegante Methode zur Darstellung der Zellwand gewisser *Bacillussubspezies* im Phasenkontrastmikroskop dar.

Zusammenfassung.

Die von *Tomcsik* und *Guex-Holzer* erstmals beschriebene «nichtspezifische Zellwandreaktion» wurde an *Bacillus M.*, *Bac. megaterium*, *Bac. anthracis*, *Bac. cereus* und *Bac. subtilis* überprüft. Während *Bac. anthracis* keine positive Proteinreaktion ergab, zeigten die Zellwandreaktionen der übrigen *Bacillussubspezies*

mit verschiedenen Proteinen (Albumin, Hämoglobin, Globulin, Casein, Trypsin und Lysozym) eine strenge pH-Abhängigkeit und eine gesetzmäßige Beziehung zum isoelektrischen Punkt der Proteine. Die Proteinreaktion vermochte keinen sicheren Anhaltspunkt über die Lage des isoelektrischen Punktes der betreffenden Bakterienspezies zu liefern.

Résumé.

La réaction non spécifique de la paroi cellulaire décrite par Tomcsik et Guex-Holzer a été étudiée sur *Bacillus M.*, *Bac. megaterium*, *Bac. anthracis*, *Bac. cereus* et *Bac. subtilis*. Tandis que *Bac. anthracis* ne présente pas de réaction protéinique positive, les autres espèces du groupe *Bacillus* développent en présence de diverses protéines (albumines, hémoglobine, globuline, caséine, trypsine et lysozyme) une réaction qui dépend strictement du pH du milieu et du point isoélectrique des protéines. La réaction protéinique ne permet pourtant pas de déduire la valeur du point isoélectrique de l'espèce bactérienne testée.

Summary.

The "non-specific cell wall reaction" first described by Tomcsik and Guex-Holzer was tested on *Bacillus M.*, *Bac. megaterium*, *Bac. anthracis*, *Bac. cereus* and *Bac. subtilis*. Whilst *Bac. anthracis* showed no positive protein reaction, the reaction of the remaining bacilli spec., with various proteins (Albumen, haemoglobin, globulin, casein, trypsin and lysozyme) was strongly dependent on the pH and showed a rigid relationship to the isoelectric point of the particular protein. The protein reaction was unable to convey clear evidence of the position of the iso-electric point of the particular species of bacteria concerned.

Literatur.

1. Barer, R., R. F. A. Ross und S. Tkaczyk, 1953: Zitiert nach Mason und Powelson, 1956. — 2. Cunningham, L. W., 1954: Zitiert nach Green und Neurath, 1954. — 3. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen, S. 101, 1955. — 4. Gladstone, G. P., und P. Fildes: Brit. J. exp. Path. 21, 161, 1940. — 5. Green, N. M., und H. Neurath in: The Proteins by H. Neurath and K. Bailey, New York Academic Press, Vol. II, S. 1057, 1954. — 6. Guex-Holzer, S., und J. Tomcsik: J. Gen. Microbiol. 13, 14, 1956. — 7. Harden, V. P., und J. O. Harris: J. Bact. 65, 198, 1953. — 8. Jacox, R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66, 635, 1947. — 9. Klotz, Irving M., in: The Proteins by H. Neurath and K.

- Bailey*, New York Academic Press, Vol. I B, S. 800, 1953. — 10. *Löfström*, G.: Brit. J. exp. Path. 25, 21, 1944. — 11. *Mason, Donald, J.*, und *D. M. Powelson*: J. Bact. 71, 474, 1956. — 12. *Mickle, H.*: J. Roy. Microscop. Soc. 68, 10, 1948. — 13. *Northrop, I. H.*, *M. Kunitz* und *R. M. Herriot*, 1948: Zitiert nach *Green* und *Neurath*, 1954. — 14. *Salton, M. R. J.*: 6th Symposium of The Society for General Microbiology, S. 81, 1956 a. — 15. *Id.*: Zitiert nach *K. McQuillen*, *ibid.*, S. 127, 1956 b. — 16. *Salton, R. M. J.*, und *R. W. Horne*: Biochim. biophys. Acta 7, 19 und 117, 1951. — 17. *Tomcsik, J.*: Schweiz. Z. Path. Bakt. 17, 456, 1954. — 18. *Id.*: Die Struktur der Bakteriengrenzflächen, in Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1956 a. — 19. *Id.*: 6th Symposium of the Society for General Microbiology S. 41, 1956 b. — 20. *Tomcsik J.*, und *J. B. Baumann-Grace*: Im Druck 1956. — 21. *Tomcsik J.*, und *S. Guex-Holzer*: Schweiz. Z. Path. Bakt. 14, 515, 1951. — 22. *Id.*: *ibid.* 15, 517, 1952. — 23. *Id.*: *ibid.* 16, 882, 1953. — 24. *Id.*: J. Gen. Microbiol. 10, 97, 1954 a. — 25. *Id.*: J. Gen. Microbiol. 10, 317, 1954 b. — 26. *Id.*: Schweiz. Z. Path. Bakt., 17, 221, 1954 c. — 27. *Weibull, C.*: J. Bact. 66, 688, 1953.